



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 29 JUL 2004
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: **Invenzione Industriale**
N. RM2003 A 000283

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, il

14 GIU. 2004

IL DIRIGENTE
Giampietro Carlotto

Giampietro Carlotto

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

MODULO A

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

A. RICHIEDENTE (I) Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano"

1) Denominazione del'Università degli Studi di Napoli Federico II

Residenza Napoli (NA)

codice

2) Denominazione

Residenza

codice

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dott. Marco Spadaro ed altri

cod. fiscale

denominazione studio di appartenenza Studio Associato CAVATTONI-RAIMONDI

via le dei Parioli

n. 160

città

Roma

cap 00197

(prov)

RM

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via

n.

città

cap

(prov)

D. TITOLO

classe proposta (saz/el/sci)

gruppo/sottogruppo

"Mezzi terapeutici e diagnostici per i papillomi"

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO: SI ☐ NO ☒

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

SE ISTANZA: DATA

N° PROTOCOLLO

1) Francesco BEGUINOT

3) Claudia MIELE

2) Pietro FORMISANO

4)

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) nessuna

2)

SCIoglimento RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) 11 PROV n. pag. 130

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

Doc. 2) 10 PROV n. tav. 1

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

Doc. 3) 10 RS

lettere d'incarico, procura o riferimento procura generale

Doc. 4) 10 RIS

designazione inventore

Doc. 5) 10 RIS

documenti di priorità con traduzione in italiano

Doc. 6) 10 RIS

autorizzazione o atto di cessione

Doc. 7) 10

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale euro duecentonovantuno/80

COMPILATO IL 10/6/106/12003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE (I)

obbligatorio

CONTINUA SI/NO NO

Dott. Marco SPADARO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

CAMERA DI COMMERCIO INDUSTRIA ARTIGIANATO E AGRICOLTURA - ROMA, codice 58

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA

RM

2003

Reg. A

000283

L'anno

duemilatre

il giorno

sei

il mese di

giugno

Il(I) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE



UFFICIALE ROGANTE

Giuseppe Tafuri

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

PROSPETTO A

NUMERO DOMANDA

REG. A

DATA DI DEPOSITO

06/06/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

00/00/00

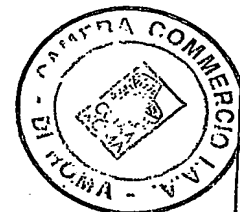
D. TITOLO

RM 2003 A 000283

"Mezzi terapeutici e diagnostici per i papillomi"

L. RIASSUNTO

La presente invenzione descrive metodi e mezzi diagnostici, nonché medicinali nella diagnosi, prognosi e cura del papilloma. Tali metodi si basano sulla determinazione dei livelli di PED/PEA-15 e i medicinali si basano su oligonucleotidi antisense. Si descrive anche un animale transgenico non umano che esprime elevati livelli di PED/PEA-15 ed è utile come modello per lo studio del papilloma e valutazione delle sue cure.



M. DISEGNO



RM 2003 A 000283

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Mezzi terapeutici e diagnostici per i papillomi"

a nome: Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare "L. Califano" dell'Università degli Studi di Napoli Federico II"

di nazionalità: italiana

con sede in: Napoli

Inventori: BEGUINOT Francesco

FORMISANO Pietro

MIELE Claudia

La presente invenzione si riferisce a mezzi per il trattamento e diagnosi del papilloma, in particolare a composti utili come medicinali per la sua terapia e ad animali transgenici utili per il suo studio e diagnosi.

Sfondo dell'invenzione

Le cellule neoplastiche, attraverso la trasformazione, acquisiscono sia l'aumento della capacità proliferativa che la perdita dell'attitudine a morire (Duke, R., et al. (1996): *Sci. Am.* 275: 80-87). Il cancro si sviluppa dopo che una cellula ha accumulato mutazioni in diversi geni che controllano la proliferazione e la sopravvivenza (Duke, R., et al. *ibid*; Thompson, C.B., (1995): *Science* 267: 1456-1472). Quando una mutazione non può essere riparata, la cellula colpita, di solito, avvia programmi di morte (apoptosi). Ma, se non muore, la cellula (o la sua progenie) può sopravvivere abba-

stanza per accumulare mutazioni che conducono alla divisione incontrollata o alla metastatizzazione (*Duke, R., et al. ibid*). In molti tumori solidi, fra cui quelli del polmone, del colon e della mammella, il danno genetico colpisce p53, una proteina necessaria perché la cellula vada in apoptosi quando il suo DNA viene danneggiato (*Thompson, C.B., ibid*). Anche altre proteine coinvolte nell'apoptosi svolgono un ruolo nella patogenesi di tumori umani. Ad esempio, in alcuni linfomi, la morte della cellula è bloccata dalla produzione eccessiva del fattore antiapoptotico BCL-2 (*Thompson, C.B., (1995): ibid*). Vi sono inoltre evidenze che indicano che alcuni tumori impediscono a Fas l'invio di segnali di morte al macchinario effettore della cellula, o inibiscono la produzione del ligando di Fas evitando così l'apoptosi immunomediata.

Cellule che divengono neoplastiche possono venire deregolate anche attraverso altri meccanismi. La tendenza delle cellule normali a suicidarsi quando vengono private dei propri fattori di crescita o delle interazioni cognitive con le cellule vicine si è probabilmente stabilita come un meccanismo di difesa contro le metastasi (*Duke, R., et al. ibid*); l'immediata attivazione dei meccanismi apoptotici in cellule tumorali migrate al di fuori della sede nativa presumibilmente distrugge molte cellule metastatiche prima che abbiano una qualche opportunità di crescita. Sfortunatamente, le cellule neoplastiche divengono spesso resistenti all'azione apoptotica della privazione dei fattori di crescita e della perdita del contatto intracellulare.

Quest'ultimo fatto costituisce un importante problema nel trattamento delle neoplasie, dove uno degli obiettivi è quello di ripristinare il naturale meccanismo di apoptosi di una cellula il cui codice genetico è stato danneggiato, causando la proliferazione incontrollata.

Alterazioni dei programmi apoptotici nelle cellule hanno anche un ruolo importante nell'acquisizione della resistenza all'effetto delle radiazioni e dei chemioterapici. Infatti, molti di questi agenti espletano la propria azione inducendo danni nel DNA ed attivando p53 che, riconosciuto il danno, innesca l'apoptosi (*Duke, R., et al. ibid*). Pertanto, cellule che difettano di p53 o che producono alti livelli di proteine inibenti la funzione di BCL-2 sviluppano resistenza all'effetto di diversi agenti antineoplastici.

Anche questo fenomeno si concretizza in un problema pratico, dal momento che molte terapie antitumorali falliscono proprio per lo sviluppo di resistenza da parte delle cellule neoplastiche.

I recettori per le citochine della famiglia del Tumor Necrosis Factor (TNF) possono innescare segnali apoptotici (*Green D.R., (1998): Cell 94: 695-698*). Fra questi recettori, quelli meglio caratterizzati ed i loro rispettivi ligandi includono TNFR1/TNF- α , Fas/FasL, TRAIL-R/TRAIL e DR3/TWEAK (*Ashkenazi, A. et al. (1999): J. Clin. Invest. 104: 155-162*). Questi recettori rappresentano importanti bersagli molecolari nella terapia del cancro (*Walczak, H., et al., (1999): Nat. Med. 5: 157-163; Ashkenazi, A., et al. (1999): J. Clin. Invest. 104: 155-162*). Per esempio, la sommini-

strazione di TRAIL è in grado di sopprimere la crescita di diversi tumori umani con una modesta tossicità (Walczak, H.; Ashkenazi, A., *ibid*).

Recentemente, i presenti inventori hanno studiato questo problema analizzando la sensibilità a TRAIL in una collezione di linee cellulari di glioma maligno umano. È stato mostrato che TRAIL, ma non il TNF- α , né FasL o TWEAK, inducono apoptosi in queste cellule (Hao, C., *et al.*, (2000): *Brain Path.* 4:730; Hao, C., *et al.*, (2001): *Cancer Res.* 61: 1162-1170). TRAIL può legare due recettori di morte, TRAIL-R1 e TRAIL-R2, e due recettori inattivi, TRAIL-R3 e TRAIL-R4 (Pan, G., *et al.*, (1997): *Science* 276: 111-113; Pan, G., *et al.*, (1997): *Science* 277: 815-818; Walczak, H., *et al.*, (1997): *EMBO J* 16: 5386-5397; Chaudhary, P.M., *et al.*, (1997): *Immunity* 7: 821-830; Sheridan, J.P., *et al.*, (1997): *Science* 277: 818-821; Pan, G., *et al.*, (1998): *FEBS Lett.* 424: 41-45; Masters, S.A., *et al.*, (1997): *Curr. Biol.* 7: 1003-1006). TRAIL-R1 e TRAIL-R2 posseggono un motivo intracellulare, denominato death domain (DD) e necessario per l'attivazione della caspasi-8 e della cascata di caspasi a valle della caspasi-8 che inducono l'apoptosi (Pan, G., *et al.*, (1997): *Science* 276: 111-113). Analogamente a Fas e a TNF-R1, l'attivazione della cascata di caspasi da parte di TRAIL-R1 e 2 avviene attraverso il reclutamento delle proteine adattatrici TRADD e FADD sui recettori (Walczak, H., *et al.*, (1997): *EMBO J.* 16: 5386-5397; Chaudhary, P.M., *et al.*, (1997): *Immunity* 7: 821-830). FADD, a sua volta, lega la caspasi-8 mediante il



proprio death effector domain (DED), attivando la cascata delle caspasi (Cryns, V. and Yuan, J., (1998): *Genes and Development* 12:1551-1570). Ci sono anche evidenze, tuttavia, che TRAIL induca apoptosi attraverso meccanismi indipendenti da FADD (Sheridan, J.P., et al., (1997): *Science* 277: 818-821). Inoltre, l'apoptosi indotta da TRAIL in cellule umane coinvolge la funzione di JNK (Herr, I., et al., (1999): *Cell Death and Differentiation* 6: 130-135). Diversamente da TRAIL-R1 e da TRAIL-R2, TRAIL-R3 e TRAIL-R4 non sono in grado di innescare segnali di morte (Pan, G., et al., (1997): *Science* 277: 815-818; Sheridan, J.P., et al., (1997): *Science* 277: 818-821; Marsters, S.A., et al., (1997): *Curr. Biol.* 7: 1003-1006), suggerendo che possano avere un ruolo antiapoptotico. Studi recenti, tuttavia, hanno dimostrato che l'espressione di questi recettori inattivi è piuttosto modesta in molte cellule tumorali e che, nelle cellule neoplastiche, l'apoptosi indotta da TRAIL è regolata principalmente a livello intracellulare (Griffith, T.S., et al., (1998): *J. Immunol.* 161: 2833-2840; Leverkus, M., et al., (2000): *Cancer Res.* 60: 553-559). Come avvenga questa regolazione è ancora poco chiaro.

Pertanto, TRAIL si propone come un importante mezzo terapeutico per la cura dei tumori.

I presenti inventori hanno anche recentemente clonato una proteina intracellulare contenente un Death Effector Domain (DED) espressa preminentemente negli astrociti (Condorelli, G., et al., (1998): *EMBO J.* 17: 3858-66). Questa proteina di 15KDa è stata

denominata PED/PEA-15. Gli iniziali studi di clonaggio di PED/PEA-15 hanno rivelato la presenza del DED e di tre siti consenso di fosforilazione da PKC (uno solo dei quali viene fosforilato da PKC nella cellula intatta (Herr, I., et al., (1999): *Cell Death and Differentiation* 6: 130-135; Griffith, T.S., et al., (1998): *J. Immunol.* 161: 2833-2840). Questi studi, tuttavia, non hanno fornito informazioni sulla funzione del trascritto proteico di PED/PEA-15. Abbiamo tuttavia dimostrato che, in diversi tipi cellulari, PED/PEA-15 blocca l'apoptosi indotta da FAS e TNF-R1 inibendo, attraverso il proprio DED, il binding di FADD a caspasi-8 (Condorelli, et al., (1999): *Oncogene* 18: 4409-4415). In cellule di glioma umano, PED blocca anche l'apoptosi indotta da TRAIL (Hao C., et al., (2001): *Cancer Res* 61: 1162-1170). Il meccanismo attraverso cui PED espleta questa azione è stato ampiamente indagato nel laboratorio della richiedente (Xiao, C., et al., (2002): *J. Biol. Chem.* 277: 25020-25025). Diversamente da altre proteine note che inibiscono l'attivazione di caspasi-8 attraverso FADD, PED previene anche l'apoptosi indotta dalla privazione dei fattori di crescita e dall'esposizione ai raggi UV e agli stimoli osmotici, indicando che, nelle cellule, PED può espletare un'azione antiapoptotica ad ampio spettro (Condorelli, G., et al., (2001): *Diabetes* 50: A298). Infatti, in studi più recenti, abbiamo dimostrato che PED/PEA-15 è in grado di bloccare molto precocemente segnali apoptotici che si trasmettono attraverso le vie di JNK e p38 (Condorelli, G., et al. (2001): *J. Biol. Chem.* 277: 11013-11018).

In collaborazione con il Dr. C. Hao (Università di Alberta, Edmonton, Canada), i presenti inventori hanno anche scoperto che PED/PEA-15 è sovraespressa nella metà delle linee cellulari di glioma umano, suggerendo un ruolo di PED nella gliomagenesi (Hao, C., et al., 2000 e 2001, vedi sopra). Nelle cellule di glioma, l'espressione di PED/PEA-15 correla con la resistenza all'apoptosi indotta da TRAIL, sicchè le cellule con bassi livelli di PED/PEA-15 mostrano sensibilità a TRAIL, mentre cellule con alti livelli di PED/PEA-15 sono resistenti (Hao, C., et al., 2000 e 2001, vedi sopra). In aggiunta, abbiamo potuto dimostrare che la trasfezione del cDNA di PED/PEA-15 nelle cellule sensibili a TRAIL le rende resistenti mentre l'espressione di un antisenso di PED/PEA-15 in cellule resistenti a TRAIL riduce il livello di PED nelle cellule e, simultaneamente, induce il recupero della sensibilità a TRAIL (Hao, C., et al., 2000, vedi sopra). La resistenza al TRAIL causata da PED può contribuire alla tumorigenesi nei gliomi ed in altri tumori.

Inoltre, la determinazione del livello di PED nei gliomi umani potrebbe consentire l'identificazione di quelli suscettibili di terapia con TRAIL, un risultato importante nella misura in cui le opportunità di trattamento attuali non hanno migliorato significativamente la sopravvivenza dei pazienti portatori di glioma maligno.

PED è sovraespressa in cellule di carcinoma squamoso metastatico del topo (Dong, G., et al., (2001): *Cancer Res.* 61: 4797-4808).

È stato ora sorprendentemente trovato che PED è anche ben espressa nei cheratinociti umani.

Allo scopo di indagare se la sovraespressione di PED abbia un ruolo nella carcinogenesi multistadio, i presenti inventori hanno prodotto un topo transgenico che sovraesprime PED/PEA nella cute. Questo animale è utile per studi di tumorigenesi cutanea (trattamento topico con DMBA, seguito da esposizioni multiple al TPA). Sorprendentemente, è stato osservato che i topi transgenici sviluppano un numero di papillomi significativamente più elevato degli animali di controllo.

Inoltre, l'espressione di PED/PEA-15 è aumentata significativamente nei papillomi rispetto alla cute normale, tanto negli animali transgenici che in quelli di controllo, suggerendo un ruolo importante di PED/PEA-15 nel determinare la suscettibilità alla carcinogenesi cutanea. Le lesioni che si sviluppano negli animali transgenici evolvono, con una frequenza significativamente maggiore, verso lo stadio carcinoma. Infine, i carcinomi sviluppatasi negli animali transgenici sono istologicamente più aggressivi.

Queste osservazioni non sono deducibili dalle conoscenze disponibili nello stato dell'arte, nè del papilloma cutaneo, nè della PED/PEA-15.



Dalle conoscenze dell'esperto del settore, è risaputo che i livelli di espressione di PED/PEA-15 nei tessuti umani non sono omogenei. Questo, assieme al fatto che non è certo che i tumori esprimano livelli più alti di proteine rispetto al tessuto normale, non permette all'esperto del settore di poter prevedere che i papillomi esprimano livelli di PED. Infatti, allo stato delle conoscenze, PED non può essere considerato un marcatore generale per i tumori. Infine, l'apoptosi, l'evento più pertinente con l'attività naturale della PED/PEA-15, non riguarda la tumorigenesi cutanea, e forse non ha nemmeno a che fare con la tumorigenesi.

Sintetizzando le conoscenze attuali sulla PED/PEA-15, sarà evidente che non esiste alcuna connessione logica disponibile all'esperto del settore, e nemmeno una chiara indicazione, con una ragionevole possibilità di successo di poter trovare PED/PEA-15 espressa nei papillomi e nemmeno le possibilità terapeutiche e diagnostiche che la scoperta alla base della presente invenzione fornisce.

Oltre alla letteratura citata sopra, si vuole anche menzionare il lavoro di *Tsukamoto, T., et al., Cancer Lett. 2000 Feb. 28; 149 (1-2): 105-13*, nel quale si descrive MAT1, un gene trasformato clonato da un tumore mammario di topo e che è stato visto essere identico alla regione 3' non tradotta della isoforma da 2,5 kb di PEA-15. Un'espressione aberrante di isoforme di MAT1/PEA-15 è stata trovata nelle linee cellulari epiteliali della mammella murina. È ben noto che gli epitelii sono cosa ben diversa dai papillomi.

A conoscenza degli inventori, l'unica applicazione industriale delle nozioni disponibili sulla PED/PEA-15 sono fornite dalla domanda di brevetto internazionale WO 02/22867, a nome Evotec Neurosciences GMBH, pubblicata il 21 marzo 2002, che descrive un metodo per diagnosticare o prognosticare il morbo di Alzheimer o altre malattie neurodegenerative sulla base della determinazione del livello di PEA-15 e il trattamento di tali malattie con un mezzo inibitore la proteina.

Dati ottenuti dai presenti inventori indicano che PED è ben espressa nei cheratinociti umani. Inoltre, uno studio disponibile in letteratura (*Dong, G., et al., (2001): Cancer Res. 61: 4797-4808*), finalizzato alla identificazione *random* di geni differenzialmente espressi in linee di cellule di carcinoma squamoso del topo, dimostra la sovraespressione di PED, insieme a differenze nell'espressione di altri 72 geni. Da questo stato dell' arte, non è possibile prevedere in alcun modo il significato funzionale della sovraespressione di PED nella tumorigenesi cutanea. Si sottolinea infatti in primo luogo che, a corredo dello studio citato, non è disponibile alcuna analisi funzionale relativa all'alterato profilo di espressione genica descritto e, in secondo luogo, lo studio citato prende in esame linee cellulari che è cosa ben diversa da cellule di una neoplasia istologicamente definita. Lo stato dell' arte consente tuttavia di individuare dei presupposti minimi per verificare la possibilità che PED abbia un ruolo nel rischio di trasformazione neoplastica di elementi cutanei, come, per esempio, la sua espressione in alcuni elementi

cellulari cutanei normali. Va anche detto che la tumorigenesi cutanea indotta attraverso carcinogeni chimici costituisce un modello estesamente utilizzato per lo studio dei meccanismi molecolari della trasformazione. Questo implica che il ruolo di un gene candidato, *ped* in questo caso, nel meccanismo della tumorigenesi cutanea può essere definito con maggiore accuratezza nel modello cutaneo rispetto ad altri sistemi.

Come accennato sopra, i topi transgenici ottenuti dai presenti inventori, mostrano un aumento della suscettibilità al rischio di tumore cutaneo nel transgenico per *ped*, e ciò è sorprendente per almeno altri due ordini di ragioni. Il primo è che le differenze nel rischio di tumore fra topi transgenici e wild-type (ed i dati di contorno quali le coerenti correlazioni fra livelli di espressione di PED e regressione del tumore o grado di malignità del tumore) sono sufficientemente ampie per raggiungere la significatività statistica già con un basso numero di animali. La seconda ragione è che la tumorigenesi cutanea successiva all'applicazione di carcinogeni chimici è un esempio accreditato di carcinogenesi multistadio, e, come tale, un fenomeno legato alla compartecipazione di un numero discreto di eventi. Il che non induce a pensare che un singolo evento (la sovraespressione di un singolo gene, in questo caso *ped*) possa influenzare in maniera così massiccia l'intera evoluzione del processo neoplastico, dal papilloma al carcinoma nei suoi diversi gradi di malignità.

Infine, la descritta funzione antiapoptotica di ped non consente di ritenere direttamente conseguente il suo ruolo nella tumorigenesi cutanea. Intanto, alterazioni dell'apoptosi hanno un ruolo definito in alcuni, ma non in tutti i tumori. Come descritto più sopra, i tumori cutanei non rappresentano, allo stato, un esempio accreditato di trasformazione nella cui patogenesi difetti dell'apoptosi hanno un ruolo ben definito. Più in generale, va ribadito il concetto che la trasformazione neoplastica è un fenomeno "multistadio". Alterazioni multiple, cioè, sono necessarie perché il fenotipo trasformato possa essere acquisito. Ne consegue che non è possibile stabilire a priori se e in che misura un evento specifico, nella fattispecie la sovraespressione di ped, possa determinare il rischio di neoplasia.



Sommario dell'invenzione

È un oggetto della presente invenzione un metodo per la diagnosi o prognosi di papilloma in un soggetto, o per la determinazione del rischio per tale soggetto di sviluppare un papilloma, oppure un metodo per il monitoraggio della progressione di un papilloma in un soggetto, oppure un metodo per la valutazione del trattamento terapeutico di un papilloma in un soggetto.

È un altro oggetto della presente invenzione un animale ricombinante non umano che comprende una sequenza genetica non nativa che codifica per PED/PEA-15, o un suo frammento, o un suo derivato.

Sono un altro oggetto della presente invenzione oligonucleotidi antisenso della PED/PEA-15 per la preparazione di un medicamento utile nel trattamento del papilloma.

Questi ed altri oggetti della presente invenzione saranno illustrati in maggior dettaglio nella descrizione che segue anche per mezzo di esempi.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Oltre a fornire metodi diagnostici, prognostici e di monitoraggio dei trattamenti del papilloma, la presente invenzione fornisce anche un modello per lo studio del papilloma, sviluppo di nuovi farmaci per il suo trattamento, che si presenta come affidabile e riproducibile.

La presente invenzione fornisce anche sostanze per la preparazione di medicinali per il trattamento del papilloma che superano il fenomeno della resistenza all'apoptosi sviluppato da certi tumori.

In una prima realizzazione dell'invenzione, il metodo per la diagnosi o prognosi di papilloma o per la determinazione del rischio di sviluppare un papilloma, comprende la determinazione del livello e/o dell'attività di:

- (a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o
- (b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in un campione proveniente da un soggetto, cui si vuole diagnosticare o prognosticare un papilloma, confrontando detto livello e/o attività con un valore di riferimento che rappresenta il valore rappresentativo di un papilloma o di uno stato di salute (di assenza o di sostanziale mancanza di probabilità di sviluppo del papilloma), e quindi formulare una diagnosi o una prognosi di papilloma in detto soggetto o determinare se detto soggetto è a rischio di sviluppo di un papilloma.

Il metodo sopra descritto si applica anche per il monitoraggio della progressione di un papilloma o per la valutazione del trattamento terapeutico in un soggetto che ne è affetto.

Secondo una realizzazione dell'invenzione, il campione da analizzare è prelevato dalla pelle.

Nel metodo secondo la presente invenzione, il valore di riferimento è il valore del livello e/o dell'attività di un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione, preso da un campione proveniente da un soggetto che non è affetto da papilloma.

Il prodotto di trascrizione e/o di traduzione e/o frammento o derivato è, rispettivamente, mRNA e/o la proteina PED/PEA-15 e/o suo frammento o derivato.

La determinazione del prodotto di trascrizione e/o frammento o derivato è fatta ricorrendo alle metodiche note all'esperto del settore, che non necessitano di ulteriore spiegazione, trovando comunque supporto nella letteratura citata. Esempi preferiti di metodiche sono l'analisi PCR, o l'analisi Northern blot.

Analogamente, il detto prodotto di traduzione e/o frammento o derivato può essere determinato, ad esempio, per mezzo di un saggio immunologico, un saggio di attività enzimatica e/o un saggio di legame.

In una ulteriore realizzazione dell'invenzione, il metodo comprende inoltre il confronto con un livello e/o attività sopradetto in una serie di campioni provenienti da detto soggetto raccolti in un periodo di tempo. Preferibilmente, il soggetto riceve un trattamento terapeutico prima della raccolta di uno dei periodi di tempo. Opportunamente, il livello e/ o attività viene determinato prima e dopo il trattamento del soggetto.

È un altro oggetto della presente invenzione un animale ricombinante non umano, preferibilmente un topo, che comprende una sequenza genetica non nativa che codifica per PED/PEA-15, o un suo frammento, o un suo derivato. Detto animale è ottenibile per mezzo di un procedimento che comprende:

(a) fornire un costrutto di bersaglio genico che comprende detta sequenza genica e una sequenza marcatrice selezionabile, e

(b) introdurre detto costrutto in una cellula staminale in un embrione non umano, e

(c) introdurre detta cellula staminale in un embrione non umano, e

(d) trapiantare detto embrione in un animale non umano pseudogravido, e

(e) far sviluppare detto embrione a termine, e

(f) identificare un animale non umano geneticamente alterato il cui genoma comprende una modifica di detta sequenza genica in entrambi gli alleli, e

(g) crescere detto animale geneticamente alterato per ottenere un animale non umano il cui genoma comprende una modifica di detto gene endogeno, dove una rottura dà luogo a una predisposizione a sviluppare un papilloma.

L'animale transgenico secondo la presente invenzione, quando opportunamente trattato, avrà una elevata probabilità di sviluppare un papilloma. Il papilloma sviluppato potrà anche essere di una forma particolarmente aggressiva. Questo animale non umano è un modello estremamente utile per lo studio e lo sviluppo di nuovi farmaci per il trattamento del papilloma, nonché per la valutazione dell'efficacia di farmaci correntemente usati in terapia. Il suo uso nel senso sopradetto rientra nell'ambito della presente invenzione.

Un altro oggetto della presente invenzione è un saggio per la selezione di una sostanza utile per il trattamento del papilloma che comprende:



(a) il mettere a contatto un modello biologico di papilloma con detta sostanza;

(b) il misurare l'attività e/o il livello di una seconda sostanza scelta nel gruppo che consiste di: un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

(c) il misurare l'attività e/o il livello di detta seconda sostanza in un campione biologico di controllo che non è stato a contatto con detta sostanza;

(d) il confrontare le attività e/o i livelli degli stadi (b) e (c) e determinare se detta sostanza in esame è un modulatore di detta seconda sostanza.

Preferibilmente, il modello di papilloma è fornito dall'animale sopra descritto.

La presente invenzione comprende anche le sostanze ottenibili dal saggio sopra descritto e il loro uso come principi attivi nella preparazione di un medicamento per il trattamento del papilloma.

In un suo altro aspetto, la presente invenzione fornisce oligonucleotidi antisenso utili come principi attivi per la preparazione di un medicamento per il trattamento del papilloma.

Gli oligonucleotidi antisenso secondo la presente invenzione sono 5'-tgacgcctccggagctgaga-3' PTO HPS (ratto specifico); 5'-tgacgcctctggagctgagc-3' PTO HPS (umano specifico).

Detti oligonucleotidi, e le sostanze ottenibili dal saggio sopra descritto, saranno formulate come medicinali nella forma di composizioni farmaceutiche, le quali rientrano negli scopi della presente invenzione.

In accordo con la presente invenzione, le composizioni farmaceutiche comprendono almeno un principio attivo, in una quantità tale da produrre un significativo effetto terapeutico. Le composizioni comprese nella presente invenzione sono del tutto convenzionali e sono ottenute con metodi di comune prassi nell'industria farmaceutica, come ad esempio illustrato in *Remington's Pharmaceutical Science Handbook*, Mack Pub. N.Y. - ultima edizione. A seconda della via di somministrazione scelta, le composizioni saranno in forma solida o liquida, adatte alla via orale, parenterale, endovenosa. Le composizioni secondo la presente invenzione comprendono assieme al principio attivo almeno un veicolo o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Possono essere particolarmente utili coadiuvanti di formulazione, ad esempio solubilizzanti, disperdenti, agenti di sospensione, emulsionanti.

I seguenti esempi illustrano ulteriormente l'invenzione.

Esempio 1

Generazione di topi transgenici ped.

PED cDNA fu clonato nei siti BamHI del plasmide pBap2 contenente il promotore della beta-actina umana. Per generare topi transgenici, il frammento ClaI daq 5.2-kb fu escisso, purificato con elettroforesi su gel di agarosio e iniettato nei pronuclei di em-

brioni di topo C57BL/6 x DBA2. Tre fondatori F0 furono identificati con analisi Southern-blot del sondaggio del DNA genomico con il frammento PstI del promotore della beta actina umana. I topi transgenici eterozigoti furono identificati con: i) Southern-blotting o con il frammento ClaI o il frammento del prodotto dell'amplificazione PCR ottenuto con i seguenti iniziatori (primers): 5'-CGCGGATCCATGGCTGAGTACGGGACCCTC-3' e 5'-GGCCTTCTTCGGTGGGGGAGCCAATTTGATGATCTCTTCCTCA-3'; ii) Northern-blotting con il frammento ClaI; iii) Western-blotting con anticorpi policlonali di coniglio verso la proteina PED.

Esempio 2

Cancerogenesi chimica.

I topi furono sottoposti a due applicazioni di 100 nmol di 9,10-dimetil-1,2-benzantracene (DMBA) in 0,2 ml di acetone sulla pelle dorsale. Nel corso di due settimane, furono eseguite ulteriori applicazioni di acetato di forbolo miristato 5 nmol (Phorbol Acetate Myristate - PMA) (due alla settimana per 16 settimane) negli stessi posti. Al termine del trattamento, i topi venivano seguiti per 16 settimane e i papillomi quantificati settimanalmente, seguiti da analisi istopatologica (Tabelle 1-3).

Tabella 1.

*Cancerogenesi chimica dopo trattamento con DMBA/PMA in topi PED⁺. Tg-PED⁺: topi transgenici PED; WT: topi controllo selvatici. *Differenze con topi WT, determinati con analisi t-test, significatività statistica ($p < 0.01$).*

	Numero di topi	M/F	Numero di papillomi/topi (8 settimane)	Numero di papillomi/topi (16 settimane)
Tg-PED+	18	10/8	7*	19*
WT	20	10/10	3	7

Tabella 2

*Regressione delle lesioni della pelle dopo termine del trattamento con PMA in topi PED+. Tg-PED+: topo transgenico PED; WT: topi controllo selvatici. * Differenze con topi WT, determinati con analisi t-test, significatività statistica ($p < 0.01$).*

	Numero di papillomi/topi (2 settimane)	Numero di papillomi/topi (8 settimane)	Numero di papillomi/topi (15 settimane)
Tg-PED+	14*	9*	6*
WT	4	2	1

**Tabella 3**

*Conversione maligna delle lesioni papillomatose al termine del trattamento con PMA in topi PED+. Tg-PED+: topo transgenico PED; WT: topi controllo selvatici. * Differenze con topi WT, determinati con analisi t-test, significatività statistica ($p < 0.01$).*

	Numero di carcinomi/lesioni	Rapporto di conversione maligna
Tg-PED+	12/48*	25%
WT	1/20	5%

Esempio 3**Saggio ELISA competitivo**

Rivestimento – Il rivestimento dei micropozzetti fu ottenuto con incubazione di PED ricombinante per 16h a 4°C (100 µl in PBS, 0,5-2,5 µg/ml). I pozzetti furono lavati tre volte con 200 µl di PBS addizionato con Tween 20 0,5% (PBS-T). La saturazione dei siti non-specifici fu ottenuta con una ulteriore incubazione con 200 µl/pozzetto di PBS contenente latte scremato 3% per 2h a 37°C,

seguita da 3 lavaggi aggiuntivi con PBS-T. La quantificazione del rivestimento GST-PED è mostrata nella Tabella 4.

Reazione antigene-anticorpo in fase solida – Per quantificare l'interazione PED-anticorpo, l'antisiero fu diluito come indicato nella Tabella 5 in PBS addizionato con latte scremato 1%. Antisieri diluiti furono aggiunti ai pozzetti (100 µl/pozzetto) e incubati per 16h a 4°C, seguito da abbondanti lavaggi con PBS-T.

Reazione colorimetrica – Anticorpi IgG di capra anticoniglio coniugati con perossidasi furono aggiunti ai pozzetti (diluizione 1:1.500 in PBS contenente latte scremato 3%) e ancora incubati per 1h a 37°C. La reazione colorimetrica era iniziata per aggiunta di 100 µl di una soluzione contenente o-fenilenediammina (1 mg/ml) e 1 µl/ml di perossido di idrogeno 30% in tampone citrato fosfato 0,1 M, pH 5,0. Dopo 20 min di incubazione a 25°C, la reazione fu bloccata per aggiunta di 40 µl/pozzetto di acido solforico. Le densità ottiche furono lette a 490 nm.

Interazione antigene-anticorpo in fase liquida - Standard GST-PED in PBS con latte scremato 1% furono incubati con antisiero PED (diluizione 1:6.400 in PBS latte 1%) per 2h a 37°C.

L'incubazione in fase solida fu successivamente ottenuta come descritto sopra.

Tabella 4

*Valutazione della concentrazione di PED adeguata per il rivestimento dei micropozzetti. Diluizione dell'anticorpo 1:6.400. * Differenze tra i valori furono analizzate con t-test ed erano statisticamente significative ($p < 0,01$).*

concentrazione PED ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,5	1,25	2,50
O.D. 490 nm *	0,22	0,80	1,50	2,30

Tabella 5

Valutazione della diluizione dell'anticorpo (Ab) antiPED per la rivelazione immunoenzimatica della proteina PED (2,5 $\mu\text{g/ml}$ per rivestimento di pozzetto). * Differenze tra i valori furono analizzate con t-test ed erano statisticamente significative ($p < 0,01$). § Differenze non erano statisticamente significative).

diluizione Ab	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
O.D. 490 nm	3,50§	3,40§	3,45§	3,20§	2,7*0

diluizione Ab	1:6400	1:12800	1:25600	NO Ab
O.D. 490 nm	2,30*	0,9*	0,7*	0,25*

Tabella 6

Determinazione dei valori standard per la rivelazione quantitativa di PED. Anticorpi antiPED furono usati alla diluizione 1:6.400 in fase liquida. * Differenze tra i valori furono analizzate con t-test ed erano statisticamente significative ($p < 0,01$).

concentrazione di PED in preincubazione in fase liquida ($\mu\text{g/ml}$)	0	0,5	1,25	2,50
O.D. 490 nm	2,30*	1,85*	1,25*	0,65*

Esempio 4

Inibizione dell'espressione di PED.

Il blocco dell'espressione di PED in cellule di insulinoma di ratto (RIN-1) e glioma umano (U373MG) fu ottenuto per trasfezione del seguente oligonucleotide antisense fosforotioato (4 $\mu\text{g}/60$ mm disco per cellule). 5'tgacgcctccggagctgaga-3' PTO HPS (ratto specifico); 5'tgacgcctctggagctgagc-3' PTO HPS (umano specifico). La trasfezione antisense fu eseguita con il reagente Lipofectamine (Invitrogen Cat. No. 18324-012) secondo le istruzioni del

fabbricante. La quantificazione dell'azione antisenso sull'espressione della proteina PED in cellule RIN-1 è mostrata nella Tabella 7.

Tabella 7

Determinazione dei livelli endogeni di PED in cellule di insulinoma di ratto (RIN-1) e glioma umano (U373MG) dopo trattamento con oligonucleotidi PED antisenso o controllo.

** Differenze tra i valori furono analizzate con t-test ed erano statisticamente significative ($p < 0,01$).*

Abbondanza relativa di PED	nessuna aggiunta	Oligo controllo	Oligo PED-AS
RIN-1	100	95±8	21±4 *
U373MG	100	92±9	24±5 *

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per la diagnosi o prognosi di papilloma in un soggetto, o per la determinazione del rischio per tale soggetto di sviluppare un papilloma, che comprende la determinazione del livello e/o dell'attività di:

(a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in un campione proveniente da detto soggetto e confrontando detto livello e/o attività con un valore di riferimento che rappresenta il valore rappresentativo di un papilloma o di uno stato di salute, e quindi formulare una diagnosi o una prognosi di papilloma in detto soggetto o determinare se detto soggetto è a rischio di sviluppo di un papilloma.

2. Metodo per il monitoraggio della progressione di un papilloma in un soggetto, che comprende la determinazione del livello e/o dell'attività di:

(a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o



(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in un campione proveniente da detto soggetto e confrontando detto livello e/o attività con un valore di riferimento che rappresenta il valore rappresentativo di un papilloma o di uno stato di salute (di assenza di sviluppo del papilloma), e quindi monitorare la progressione del papilloma.

3. Metodo per la valutazione del trattamento terapeutico di un papilloma in un soggetto, che comprende la determinazione del livello e/o dell'attività di:

(a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in un campione proveniente da detto soggetto e confrontando detto livello e/o attività con un valore di riferimento che rappresenta il valore rappresentativo di un papilloma o di uno stato di salute (di assenza di sviluppo del papilloma), e quindi valutare il trattamento del papilloma.

4. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-3, dove detto campione è un campione di pelle.

5. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-4, dove detto valore di riferimento è il valore del livello e/o dell'attività di:

(a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in un campione proveniente da un soggetto che non è affetto da papilloma.

6. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-5, dove detto prodotto di trascrizione e/o di traduzione e/o frammento o derivato è, rispettivamente, mRNA e/o la proteina PED/PEA-15 e/o suo frammento o derivato.

7. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-6, dove detto prodotto di trascrizione e/o frammento o derivato è, determinato per mezzo dell'analisi PCR o dell'analisi Northern blot.

8. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-6, dove detto prodotto di traduzione e/o frammento o derivato è, determinato per mezzo di un saggio immunologico, un saggio di attività enzimatica e/o un saggio di legame.

9. Il metodo secondo una delle rivendicazioni 1-8, che comprende inoltre il confronto con un livello e/o attività di

(a) un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(b) un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o

(c) un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

in una serie di campioni provenienti da detto soggetto raccolti in un periodo di tempo.

10. Il metodo secondo la rivendicazione 9, dove detto soggetto riceve un trattamento terapeutico prima della raccolta di uno dei periodi di tempo.

11. Il metodo secondo le rivendicazioni 9 e 10, dove detto livello e/o attività viene determinato prima e dopo il trattamento di detto soggetto.

12. Animale ricombinante non umano che comprende una sequenza genetica non nativa che codifica per PED/PEA-15, o un suo frammento, o un suo derivato, ottenibile per mezzo del procedimento che comprende:

(a) fornire un costrutto di bersaglio genico che comprende detta sequenza genica e una sequenza marcatrice selezionabile, e

(b) introdurre detto costrutto in una cellula staminale in un embrione non umano, e

(c) introdurre detta cellula staminale in un embrione non umano, e

(d) trapiantare detto embrione in un animale non umano pseudogravido, e

(e) far sviluppare detto embrione a termine, e

(f) identificare un animale non umano geneticamente alterato il cui genoma comprende una modifica di detta sequenza genica in entrambi gli alleli, e

(g) crescere detto animale geneticamente alterato per ottenere un animale non umano il cui genoma comprende una modifica di detto gene endogeno, dove una rottura dà luogo a una predisposizione a sviluppare un papilloma.

13. Uso dell'animale della rivendicazione 19 come modello per lo studio del papilloma e/o dello sviluppo di medicinali per il suo trattamento e/o per la valutazione dell'efficacia di medicinali nel trattamento del papilloma.

14. Saggio per la selezione di una sostanza utile per il trattamento del papilloma che comprende:

(a) il mettere a contatto un modello biologico di papilloma con detta sostanza;

(b) il misurare l'attività e/o il livello di una seconda sostanza scelta nel gruppo che consiste di: un prodotto di trascrizione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un prodotto di traduzione di un gene che codifica per la PED/PEA-15, e/o un frammento o derivato di detto prodotto di trascrizione o traduzione,

(c) il misurare l'attività e/o il livello di detta seconda sostanza in un campione biologico di controllo che non è stato a contatto con detta sostanza;



(d) il confrontare le attività e/o i livelli degli stadi (b) e (c) e determinare se detta sostanza in esame è un modulatore di detta seconda sostanza.

15. Saggio secondo la rivendicazione 14, nel quale detto modello di papilloma è l'animale della rivendicazione 12.

16. Sostanze utili per il trattamento del papilloma ottenibili dal saggio della rivendicazione 14 o 15.

17. Oligonucleotidi antisenso 5'-tgacgcctccggagctgaga-3' e 5'-tgacgcctctggagctgagc-3'.

18. Uso delle sostanze della rivendicazione 16 o degli oligonucleotidi della rivendicazione 17 per la preparazione di un medicamento per il trattamento del papilloma.

19. Composizioni farmaceutiche comprendenti almeno una sostanza della rivendicazione 16 o almeno un oligonucleotide della rivendicazione 17 in miscela con almeno un veicolo o eccipiente farmaceuticamente accettabile.

p.i. di Dipartimento di Biologia e Patologia Cellulare e Molecolare

"L. Califano" dell'Università degli Studi di Napoli Federico II"

Dott. Marco Spadaro

